

Caracterización del mapa triptico de la eritropoyetina humana recombinante por espectrometría de masas

✉ Galina Moya, Yanet Tambara, Elias N Rodríguez,
Luis J González, Vladimir Besada

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), PO Box 6162, Habana 10600, Cuba.
Telf.: +(537)-271 60 22; E-mail: galina.moya@cigb.edu.cu

RESUMEN

Se estableció el mapa peptídico para el control de calidad de la eritropoyetina humana recombinante obtenida en las condiciones descritas en la cuarta edición de la Farmacopea Europea. Se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa. Los péptidos resultantes de la digestión triptica de esta eritropoyetina se analizaron por espectrometría de masas. Se identificaron en el mapa los péptidos correspondientes a los extremos N y C, los tres sitios de N glicosilación y el sitio de O glicosilación publicados para esta proteína. Con este análisis se logró la comprobación de los puentes disulfuro y una verificación del 96,4 % de la secuencia aminoacídica.

Palabras claves: mapeo peptídico, eritropoyetina

Biotecnología Aplicada 2003;20:214-219

ABSTRACT

Tryptic map of the recombinant human erythropoietin. The peptide mapping was established in compliance with the requirement of European Pharmacopoeia for the quality control of the raw material of human recombinant erythropoietin produced in the Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Havana. The tryptic peptides were analyzed by mass spectrometry. The peptides corresponding to N- and C-termini, the three N-glycosylation (N^{24} , N^{38} y N^{83}) and the O-glycosylation (S^{126}) sites were identified in the tryptic map. The disulfide bonds and 96,4 % of the amino acid sequence were verified.

Keywords: peptide mapping, erythropoietin

Introducción

Uno de los métodos más poderosos para la identificación y caracterización de proteínas es el mapeo peptídico, una técnica ampliamente usada y aceptada en la industria biotecnológica para el control de calidad lote a lote. Este método consiste en la hidrólisis, química o mediante el empleo de proteasas específicas, de la cadena polipeptídica originando péptidos derivados de la proteína. La mezcla de péptidos resultantes se separa, generalmente por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (rp-HPLC), para producir un mapa que en las condiciones establecidas es típico para cada proteína [1].

Desde finales de la década de 1970 el mapeo peptídico se introdujo y aplicó para la verificación de la secuencia aminoacídica de proteínas. Este método analítico ha sido particularmente apropiado para los productos de la tecnología del ADN recombinante donde es imprescindible verificar que el producto del gen clonado es idéntico a la proteína natural. Es significativo destacar la capacidad del mapeo peptídico para detectar una gran variedad de modificaciones postraduccionales que pueden ser originadas durante el proceso fermentativo o de cultivo celular y/o en las etapas de extracción y purificación. Por tal motivo no es sorprendente que tanto el sector industrial como las agencias regulatorias hayan adoptado el mapeo peptídico como el primer método para caracterizar y liberar este tipo de productos [1-5].

La eritropoyetina humana (EPOh) es una hormona producida en el riñón y el hígado de los adultos [6-9]; es el principal factor responsable para la regulación de la producción de glóbulos rojos en sangre [10-14] y se ha utilizado ampliamente en el tratamiento de pacien-

tes con insuficiencia renal crónica y de algunos tipos de anemias [11, 15-20]. La EPOh es una glicoproteína de 165 residuos aminoacídicos con un peso molecular que oscila entre de 34 000 y 39 000 Da [21-24] donde la glicosilación es responsable de aproximadamente el 40 % de la masa molecular. En su estado natural se presenta como una familia de isoformas, también llamadas glicofomas, que difieren ligeramente en los patrones de glicosilación, lo cual puede ser caracterizado por las diferencias en punto isoeléctrico de las distintas subespecies. La glicosilación es muy importante para la actividad de la eritropoyetina fundamentalmente porque prolonga el tiempo de vida media de la proteína en la sangre [25, 26]. El gen de la EPOh ha sido clonado [6, 7, 17, 19] y la hormona expresada en cultivos de células de mamíferos [26-29]. Los mejores resultados se han obtenido en líneas celulares derivadas de ovario de hámster chino (CHO) [27,30-31]. En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, Cuba, se trabajó en la obtención de esta biomolécula por técnicas de recombinación de ADN [32], y se ha establecido un proceso productivo con este fin.

Desde los primeros estudios de caracterización de esta biomolécula obtenida por vía natural [33] el mapeo peptídico se ha utilizado como herramienta indispensable para la verificación de su estructura primaria. En la caracterización de la EPOh recombinante (EPOhr) también se ha publicado el empleo de la digestión con Lys C [34] y el tratamiento con tripsina [33] u otras enzimas [35] mediante la cromatografía de fase reversa y la electroforesis capilar acopladas a espectrometría de masas para la separación e identificación de los péptidos.

1. Ganzler K, Warne NW, Hancock WS. Capillary electrophoresis in analytical biotechnology. Boca Ratón (FL):CRC Press;1996.p.183-238.

2. Kalghatgi K, Horvath C. Rapid peptide mapping by HPLC. J Chrom 1988;443:343-54.

3. Garnick RL, Ross MJ, Baffi RA. Characterization of proteins from recombinant DNA manufacture. In: Chen YH, Grengwan JL, editors. Drug Biotechnology Regulation. Marcel Dekker Inc;1991.263-300.

4. Garnick RL Peptide mapping for detecting variants in protein products. Develop Biol Standard 1992;76:117-30.

5. Choli-Papadopoulou T, Kamp K. Separation of peptides using HPLC and TLC fingerprints. In: Kamp K, Choli-Papadopoulou T, Wittmann-Liebold B, editors. Protein structure analysis. preparation, characterization and microsequencing. Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag; 1997.p.73-83.

6. da Silva JL, Schwartman ML, Goodman A, Levere RD, Abraham NG. Localization of erythropoietin mRNA in the rat kidney by polymerase chain reaction. J Cell Biochem 1994;54:239-46.

7. Darby IA, Evans BA, Fu P, Lim GB, Moritz KM, Wintour EM. Erythropoietin gene expression in fetal and adult sheep kidney. Br J Hematol1995;89:266-70.

8. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. Blood 1991;77:2497-503.

Para armonizar los procedimientos de trabajo que existían en diversas partes del mundo para el análisis de la EPOh con esta técnica analítica, el Departamento Europeo para la Calidad de los Medicamentos (EDQM) condujo un estudio colaborativo para estudiar esta y otras técnicas usadas comúnmente en la caracterización y liberación del producto, establecer el estándar biológico internacional y evaluar su inclusión en la Farmacopea Europea [36]. Sin embargo no se han encontrado datos de la asignación, por espectrometría de masas, de los péptidos obtenidos cuando se utilizan las condiciones recomendadas por la Farmacopea Europea [37].

El objetivo de este trabajo fue la caracterización por espectrometría de masas del mapa triptico de la EPOh cuando se utilizan las condiciones recomendadas por la Farmacopea Europea.

Materiales y Métodos

Muestras

La EPOh se expresó en un mutante de una línea de células de ovario de hamster chino salvaje CHO dhfr⁽⁻⁾, transformada con los plásmidos pKEPO y pSV2dhfr. El proceso de cultivo se realizó en botellas de rotación dada la dependencia de anclaje de la línea celular. La proteína de interés se expresa de forma extracelular en el sobrenadante de cultivo. La purificación se realizó a través de 3 pasos cromatográficos secuenciales que incluyó: una filtración en gel, un intercambio aniónico y una cromatografía de interacciones hidrofóbicas, seguido de un paso de concentración diafiltración y una etapa de purificación final en HPLC equipado con columna de filtración en gel.

Se utilizaron 4 lotes de ingrediente farmacéutico activo de la EPOh así como el material de referencia de trabajo (EPO-02-0101) preparado en el CIGB.

Desalinización de las muestras

Previo a la digestión triptica los 4 lotes y el material de referencia se desalinizaron utilizando una minicolumna de filtración en gel Hi-Trap Desalting (Amershan Bioscience, Suecia). Posteriormente se determinó la concentración de las muestras a 280 nm y se utilizó el coeficiente de extinción 7,43 [37]. Para cada muestra el volumen correspondiente a 50 µg de EPOh se concentró a sequedad y se disolvió en tampón Tris/Acético 0,1 M pH 8,5 hasta una concentración de 1 mg/mL.

Digestiones Tripticas

A 50 µg de EPOh se le adicionó 1 µg de tripsina (Promega, USA) y la reacción se mantuvo a 37 °C durante 18 h [37]. La digestión enzimática se detuvo mediante acidificación a pH 2,0. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la separación cromatográfica.

Digestión con PNGasa F

Previo a la reacción con PNGasaF (Biolab, Inglaterra) los péptidos glicosilados colectados en la cromatografía en fase reversa después de la digestión triptica se secaron en una centrifuga evaporadora y se disolvieron en una solución tampón de fosfato de sodio 20 mM pH 7,8. La relación enzima/sustrato fue de 5 UI

de PNGsaF por mg de EPOh, la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 h y posteriormente se purificó por rp-HPLC con las mismas condiciones empleadas para separar las digestiones tripticas.

Oxidación de los péptidos tripticos

A la mezcla de los péptidos tripticos (50 µL) se le adicionó 1 µL de peróxido de hidrógeno al 30 % y se mantuvo a 37 °C durante 2 h, el producto de la reacción se aplicó directamente a la columna de fase reversa.

RP-HPLC

Se utilizó un sistema de HPLC equipado con una bomba L-7100 (Merck-Hitachi, Alemania); un detector de longitud de onda variable, un horno y un desgasificador (KNAUER, Alemania). Se utilizó una columna de fase reversa (C₄, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm) (Vydac, USA) como recomienda la Farmacopea Europea. Las soluciones de trabajo fueron: (A) 0,1 % de TFA y (B) 0,05 % TFA en acetonitrilo. La corrida cromatográfica comienza con 0 % de la solución B que se mantiene constante durante 10 min. De los 10 a los 125 min se aplicó un gradiente isocrático de 0 a 61 % de la solución B. Como las soluciones utilizadas no son exactamente las notificadas por la Farmacopea Europea, el gradiente se ajustó para obtener los mismos porcentajes de acetonitrilo en el tiempo y mantener así la pendiente del gradiente. Se aplicó en la columna todo el volumen de la reacción. La absorbancia se registró a 214 nm, el flujo de trabajo fue 0,75 mL/min y la temperatura de trabajo fue de 30 °C. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el programa D-7000 HPLC System Manager (Merck-Hitachi, Alemania).

Espectrometría de Masas (EM)

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de configuración híbrida ortogonal Q-Tof-2 (Micromass, Inglaterra) con fuente de ionización por electronebulización Z-spray (ESI). El capilar de entrada se sometió a 3000 V y el voltaje del cono fue de 50 V. El analizador se calibró con yoduro de sodio tomado como referencia.

Los péptidos se solubilizaron en una solución de metanol 50% y ácido fórmico 0,1 % y se inyectaron a un flujo de 5 µL/min utilizando una bomba de jeringuilla (Harvard Apparatus, USA).

Para realizar la fragmentación de los iones (Disociación Inducida por Colisiones, DIC) se introdujo gas argón en la celda hexapolar de colisiones y la energía de colisiones se incrementó a 25-30 eV.

Resultados y Discusión

Para el desalado de las muestras de EPO la Farmacopea Europea recomienda el empleo de microconcentradores de centrifuga con un tamaño de poro de la membrana de 10 kDa (Amicon, USA) o la diálisis contra el tampón de reacción de la digestión. Con ambos métodos se perdió proteína que provocaron variaciones en la concentración de las muestras y afectaron la reproducibilidad del ensayo. Los mejores resultados se obtuvieron con el uso de una minicolumna Hi-trap Desalting (Amershan Bioscience, Suecia).

Los mapas tripticos del material de referencia de EPO-02-0101 y de los 4 lotes de MPA se muestran en

9. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988;81:620-3.

10. Goldwasser E, Gross M. Erythropoietin: assay and study of its mode of action. *Methods Enzimol* 1975;37:109-21.

11. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Reviews* 1992;72:449-89.

12. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991;77:419-34.

13. Porter DL, Goldberg MA. Regulation of erythropoietin production. *Exp Hematol* 1993;21:399-404.

14. Nissenson, AR. Erythropoietin overview -1993. *Blood Purif* 1994;12: 6-13.

15. Kurtz A, Eckardt KU. Erythropoietin production in chronic renal disease before and after transplantation *Contrib Nephrol* 1990;87:15-25.

16. Means RT. Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia. *Stem Cells* 1995;13:32-7.

17. Doweiko JP. Management of the hematologic manifestations of HIV disease. *Blood Reviews* 1993;7:121-6.

18. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Erythropoietin. *New Engl J Med* 1990;322:1689-92.

19. Tabbara IA. Erythropoietin. Biology and clinical applications. *Arch Intern Med* 1993;153:298-304.

20. Tasaki T, Ohto H, Hashimoto C, Abe R, Saitoh A, Kikuchi S. Recombinant human erythropoietin for autologous blood donation: effects on perioperative red-blood-cell and serum erythropoietin production. *Lancet* 1992;339 (8796): 773-5.

21. Lai PH, Everett R, Wang F, Arakawa T, Golwasser E. Structure characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1986;261:3116-21.

22. Sawyer ST, Penta K. Erythropoietin cell biology. *Hematol Oncol Clinics NA* 1994; 8:895-911.

23. Jacobs K, Shoemaker C, Ruderdorf R, Nelly SD, Kaufman RM, Mufson A, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-10.

24. Lin FK, Sunggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the recombinant human erythropoietin gen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7580-4.

25. David JM, Arkawa T, Strickland TW, Yphantis DA. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1987; 26:2633-8.

26. Bunn HF. Erythropoietin: current status. *Yale J Biol Med* 1990;63(5):381-6.

27. Dubé S, Fisher JW, Powell JS. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J Biol Chem* 1988; 266:17516-21.

la figura 1 (A-E), los péptidos de cada digestión fueron colectados y analizados por ESI-EM, los resultados aparecen resumidos en la tabla 1.

Las masas moleculares determinadas experimentalmente se compararon con las esperadas para cada péptido triptico, teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos deducida del ADN clonado y la especificidad de la enzima empleada (tripsina), que hidroliza el enlace peptídico por el extremo C de lisina (K) y la arginina (R). Las digestiones proteolíticas se efectuaron en condiciones no reductoras por lo que se conservaron los puentes disulfuros.

Como se muestra en la tabla 1, se identificaron los péptidos que contenían los 2 puentes disulfuros (fracciones 6 y 15) cuyos valores de masas correspondieron a los esperados lo que demostró su formación correcta. También se identificó el péptido N-terminal de la proteína (fracción 1). En ningún caso se detectó modificación del extremo N-terminal. Sin embargo, este péptido es muy pequeño e hidrofílico y eluye prácticamente con la fracción no retenida por lo que en algunas ocasiones pudiera no ser detectado.

El péptido del extremo carboxilo se pudo verificar a partir de un corte incompleto de la tripsina (fracción 15). El corte enzimático en la R¹⁶² puede afectarse porque este aminoácido está precedido por una cisteína involucrada en un enlace disulfuro lo que dificulta la

acción de la proteasa. El tetrapéptido del extremo carboxilo de la proteína ¹⁶³TGDR¹⁶⁶, (figura 2) debido a la digestión completa, tampoco fue observado en estos lotes. Esto puede deberse a que el péptido, que es muy hidrofílico, no se retiene en la columna C₄ y pudiera eluir con la fracción no retenida o a que no hubo corte en la R¹⁶². Cuando la digestión es incompleta, con el mapa triptico se puede obtener mayor información de la integridad de la molécula y en ese caso se puede verificar si hubo procesamiento del extremo carboxilo de la proteína.

Por la forma ensanchada de los picos (7+8) y (12+13), en el mapa de rp-HPLC del material de referencia (figura 1), se suponía la presencia en ellos de los glicopéptidos característicos de esta proteína, por lo que estos péptidos fueron deglicosilados con PNGasaF y purificados nuevamente por rp-HPLC. Esta glicohidrolasa elimina los azúcares N-enlazados a la proteína y como consecuencia las asparaginas N-glicosiladas se convierten en ácido aspártico. Al ser analizados estos péptidos por ESI-EM se comprobó la presencia de los respectivos péptidos que contienen los sitios de N-glicosilación ubicados en las Asn 24, 38 y 83 y apareció además un O-glicopéptido que se mantuvo intacto durante el tratamiento con PNGasaF pues esta enzima solo reconoce a los residuos de asparaginas N-glicosiladas. Como se aprecia en la figura 1, la forma

28. Goto M, Akai K, Murakami A, Hashimoto C, Tsuda E, Ueda M, et al. Production of recombinant erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Biotechnology* 1988;6:67-71.

29. Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kubota M, Wada M, Shimizu R, et al. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7819-22.

30. Tsuda E, Goto M, Murakami A, Akai K, Ueda M, Kawanishi G, et al. Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry* 1988;27:5646-54.

31. Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1987;26:2633-8.

32. Jiménez V, Guimil R, de la Fuente J, Lleonard R, Rubiera R, Villegas R, et al. Síntesis total del gen de la eritropoyetina humana. *Biología Aplicada* 1991;8:326-34.

33. Lai P, Everett R, Wang F, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1986;261:3116-21.

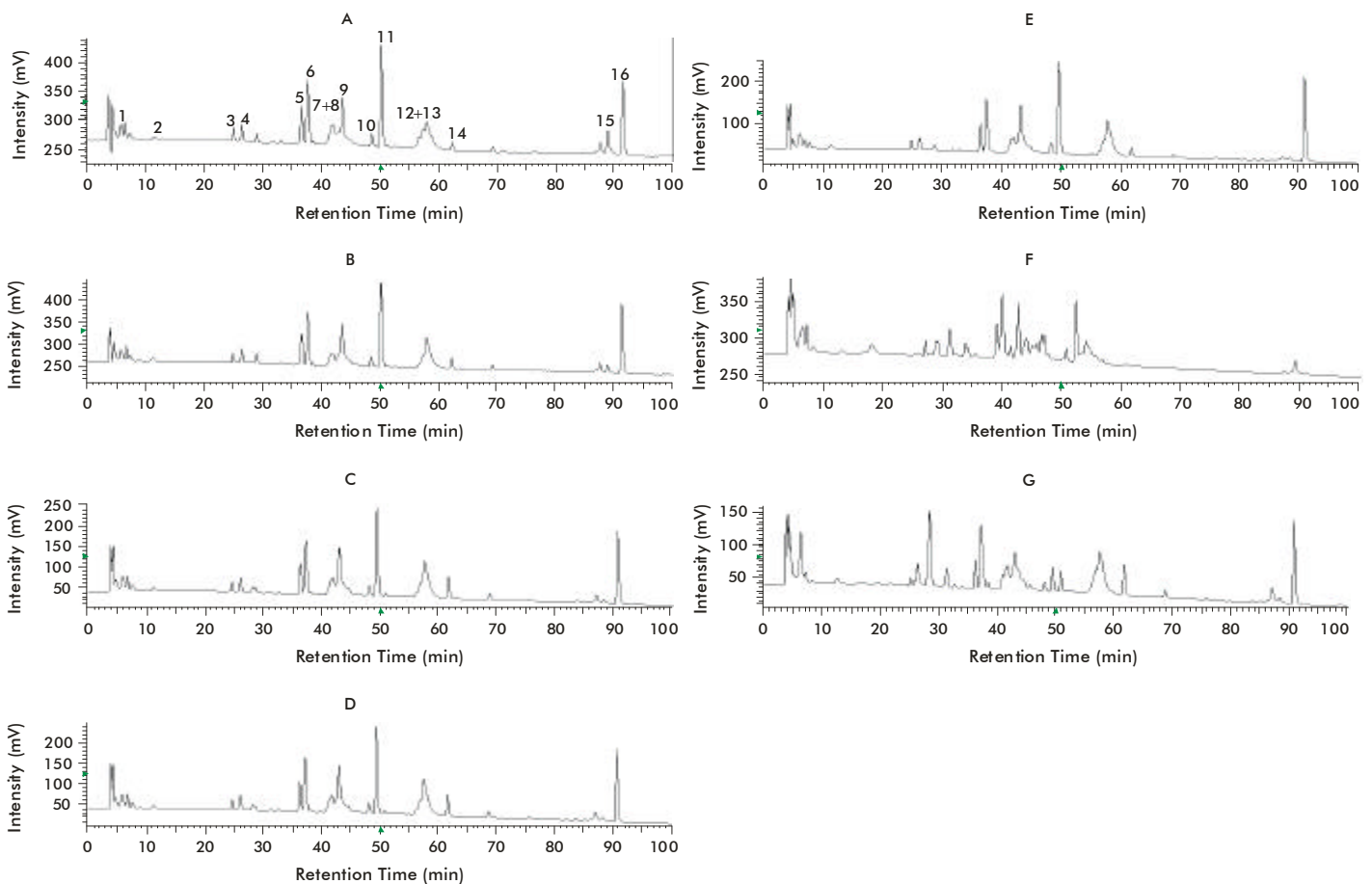


Fig. 1. Comparación de los mapas tripticos del Material de Referencia de la EPOhr (A) y de varios lotes de ingrediente farmacéutico activo de EPOhr. B-E: lotes aprobados por el mapeo peptídico, F y G: lotes rechazados por el mapeo peptídico que presentaron problemas durante el cultivo celular y en el proceso de purificación, respectivamente.

identificación sin ambigüedades de los péptidos correspondientes a los extremos N- y C- de la proteína. El inconveniente del uso de endopeptidasa Lys-C está en el hecho de que la EPO sólo presenta 7 residuos de lisina en su secuencia, por lo que se obtienen péptidos muy grandes como producto de la reacción.

Con el mapeo triptico establecido se detectaron cambios en la estructura de varios lotes que presentaron problemas durante el proceso productivo. La figura 1 (F y G) muestra 2 lotes afectados donde se observaron cambios significativos en el mapa triptico. Al compararlos con el mapa triptico del MR EPO-02-0101, se detectaron alteraciones fundamentales en los péptidos glicosilados (Fig. 1F) aunque también se observó la desaparición o el corrimiento de los péptidos 11 (en ambos lotes) y 16 (Fig. 1G) y por estos motivos fueron rechazados por este análisis. Se pudo comprobar mediante un análisis de trazabilidad que ambos lotes presentaron alteraciones durante los procesos de cultivo (Fig. 1F) y de purificación (Fig. 1G).

Entre las modificaciones químicas más frecuentes en las proteínas se encuentra la formación de residuos de metionina sulfóxido. Esta modificación se origina mediante un proceso oxidativo cuando la metionina incorpora un átomo de oxígeno en el átomo de azufre de su cadena lateral. Esta modificación puede originarse tanto *in vivo* como *in vitro* durante los procesos de purificación y/o almacenamiento [40].

Con el objetivo de demostrar que el mapeo peptídico es capaz de detectar esta modificación, la mezcla de los péptidos tripticos del material de referencia se oxidó con peróxido de hidrógeno y se obtuvo el mapa triptico (Fig. 3A). Al comparar este mapa triptico con el obtenido para el material de referencia (Fig. 3B) se observó el corrimiento de varias fracciones hacia tiempos de retención inferiores. Este resultado está en concordancia con el hecho de que péptidos con residuos de metionina sulfóxido son más hidrofílicos que sus homólogos que poseen la metionina intacta [41].

Las fracciones que disminuyeron sus tiempos de retención (Figura 4A) con respecto al material de referencia (Figura 4B) fueron analizadas por ESI-MS y los valores de masas de las señales observadas (Figuras 5B y D) fueron superiores en 16 Da con respecto a los valores de masas esperados (Figuras 5A y C) para los péptidos tripticos que eluyen en esas fracciones. Esta diferencia de masa concuerda con la adición de un átomo de oxígeno a la secuencia de los péptidos $^{54}\text{Met-Arg}^{76}$ y $^{54}\text{Met-Leu}^{67}$ que son los únicos generados durante la digestión triptica que contienen el único residuo de metionina de la secuencia de la EPOhr.

Para confirmar la presencia de oxidación se obtuvo el espectro ESI-MS/MS del péptido $^{54}\text{Met-Arg}^{76}$ (m/z 848.10, 3+) (Figura 5). Todos los fragmentos del extremo N (series b_5 - b_{22}) que contienen los residuos de metionina incrementaron su masa molecular aproximadamente en 16 Da con respecto a los valores de masas esperados para el péptido no modificado. Por el contrario, todas las series del extremo C (y''_{1-15}) fueron detectadas a los valores de masas esperados. Este resultado demostró que el átomo de oxígeno fue incorporado en el extremo N del péptido donde se encuentra el residuo de metionina.

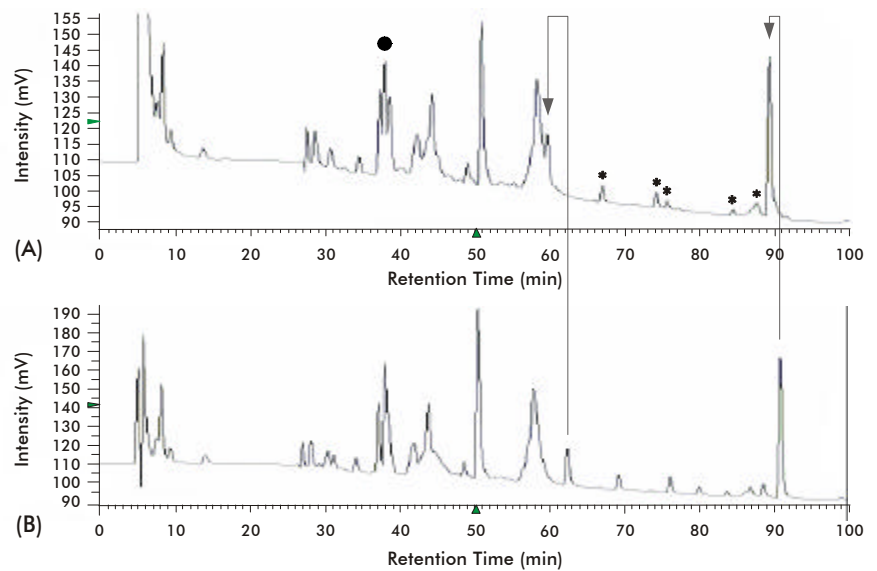


Fig. 3. (A) Mapa triptico de la EPOhr después de la oxidación con peróxido de hidrógeno. Se señalan con una flecha los péptidos que se corrieron en el mapa. (B) Mapa triptico de la muestra de EPOhr sin oxidar.

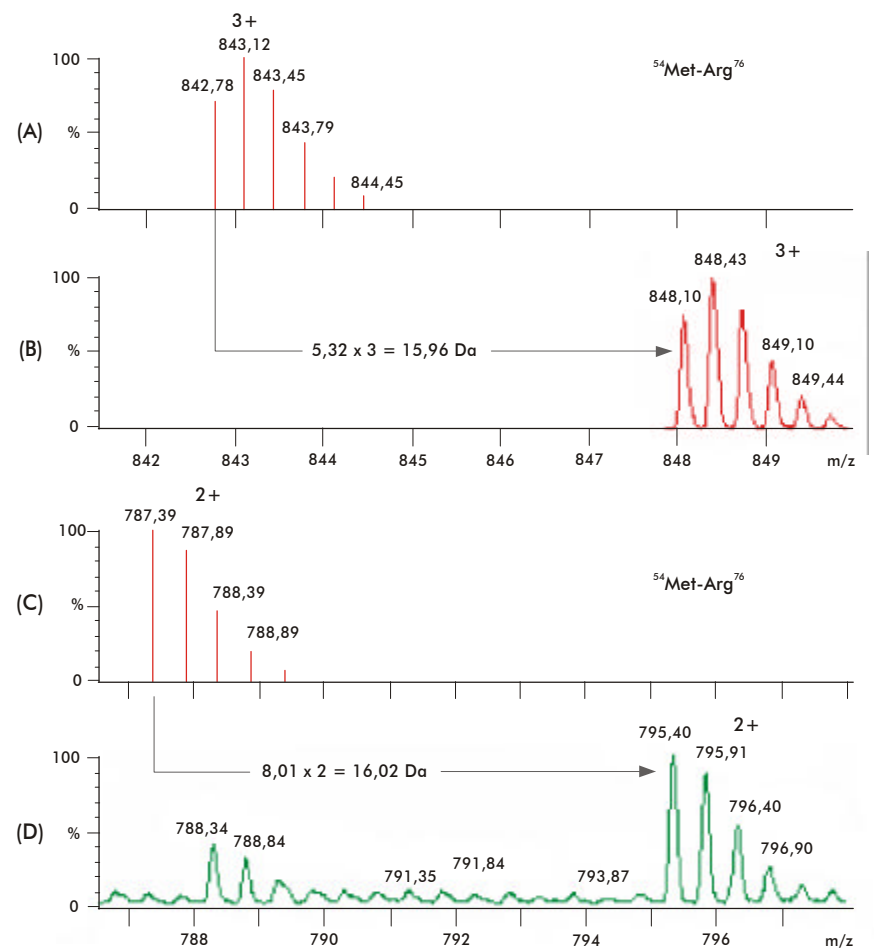


Fig. 4. (A) y (C) Espectros ESI-MS correspondientes a las distribuciones isotópicas teóricas de los péptidos $^{54}\text{Met-Arg}^{76}$ y $^{54}\text{Met-Arg}^{67}$ respectivamente. (B) y (D). Las regiones ampliadas de los espectros ESI-MS de los péptidos $^{54}\text{Met-Arg}^{76}$ y $^{54}\text{Met-Arg}^{67}$, respectivamente, después del tratamiento con peróxido de hidrógeno.

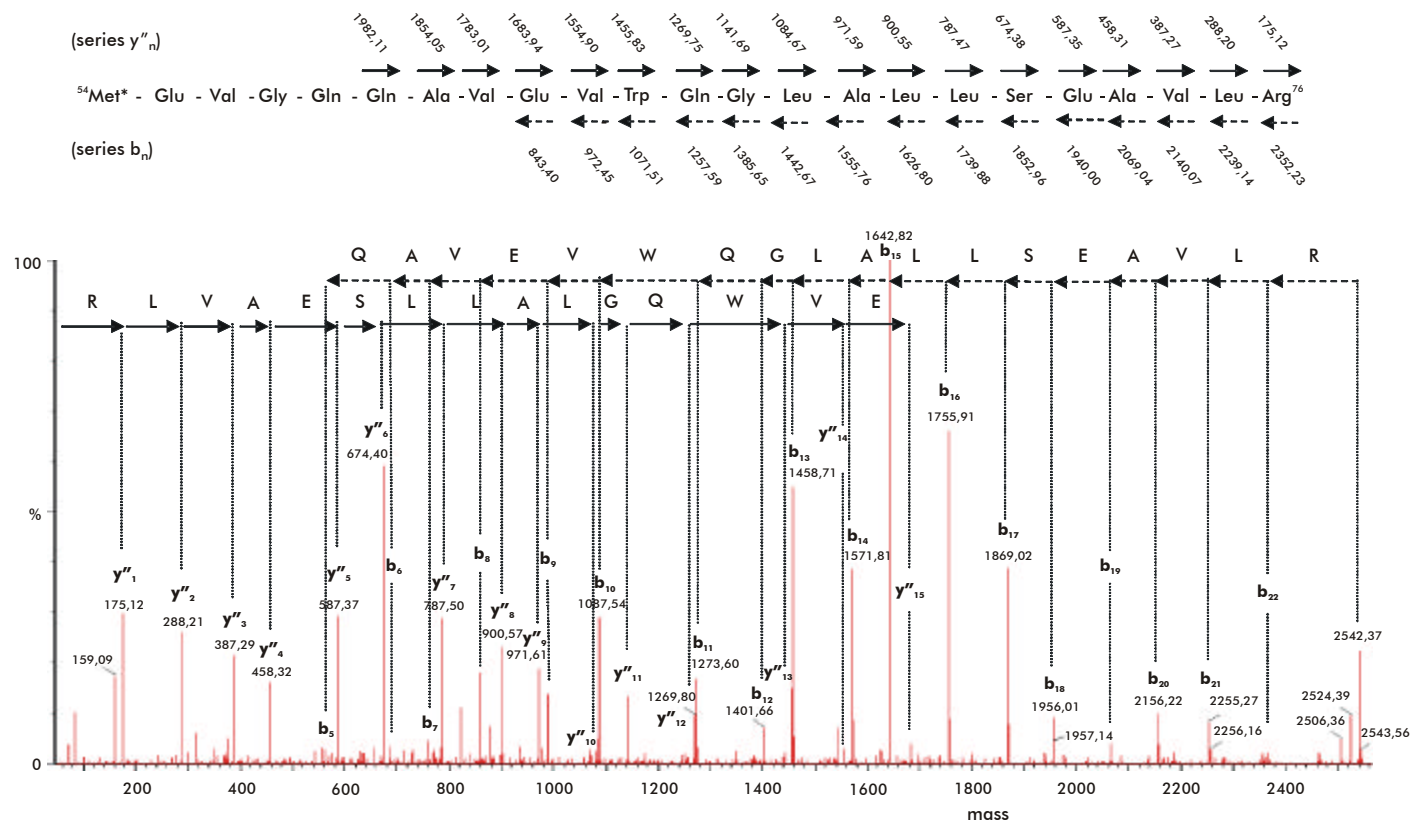


Fig. 5. Espectro ESI-MS/MS del péptido $^{54}\text{Met-Arg}^{76}$ oxidado. Los valores ubicados encima de la secuencia del péptido analizado se corresponde con los valores de masas teóricas de los iones fragmentos N- (b_n) y C-terminales (y''_n).

También otras señales minoritarias, indicadas con asteriscos en el cromatograma de la mezcla de péptidos tríplicos tratados, (Figura 3A) disminuyeron sus tiempos de retención por lo que probablemente fueron modificadas durante el proceso de oxidación. Durante su análisis por espectrometría de masas no se detectaron señales quizás por las cantidades inferiores con respecto a otras fracciones del mapa tríplico y por las pérdidas ocasionadas durante el secado de la muestra.

Además se observó una nueva fracción, marcada con un círculo negro (Figura 3A), que no había sido detectada con anterioridad en el mapa tríplico del MR EPO-02-0101 (Figura 3B). En su análisis por ESI-MS se detectó una señal de doble carga de m/z 808.36 que fue secuenciada por ESI-MS/MS; se demostró que contenía a los péptidos $^5\text{L-R}^{10}$ y $^{155}\text{L-R}^{162}$ enlazados mediante el puente de disulfuro que une a las cisteínas 7 y 161. Se tiene la certeza que esta fracción no se originó por un proceso oxidativo sino por un corte más completo de la enzima al incubar la mezcla de

péptidos con peróxido de hidrógeno durante 2 h adicionales en presencia de la tripsina.

Conclusiones

Se estableció el mapeo peptídico con las especificaciones de la Farmacopea Europea para el control de calidad de la EPOhr producida en el CIGB. Se caracterizaron por espectrometría de masas los péptidos obtenidos en el mapa tríplico y se verificó el 96,4 % de la secuencia aminoacídica. Se logró una buena reproducibilidad en los perfiles cromatográficos lo que demuestra la consistencia en el proceso productivo y se pudo comprobar que el mapeo peptídico establecido puede detectar una de las modificaciones más frecuentes en las proteínas como es la oxidación de la metionina. Se comprobó la formación correcta de los 2 puentes disulfuros de la EPOhr, la N-glicosilación en las asparaginas 24, 38 y 83, así como la O-glicosilación en la serina 126 y los extremos amino y carboxilo de la proteína. Desde hace dos años el mapeo peptídico establecido se utiliza en la liberación de los lotes de MPA de EPOhr.

40 Janis LJ, Davis GC. Analytical strategies for the determination of protein modifications. In: Brown F, Lubiniecki AS, editors. Genetic stability and recombinant product consistency. Dev Biol Stand Basel, Karger; 83:135-142.

41. Gevaert K, Van Damme J, Goethals M, Tomas GR, Hoorelbeke B, Demol H, et al. Chromatographic isolation of methionine-containing peptides for gel-free proteome. Molecular and Cellular Proteomics 2002; 1(11):896-905.

Recibido en Enero de 2003. Aprobado en Noviembre de 2003.